## WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM



Internationale Suro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12P 19/04, A61K 39/02, 39/385, 47/36

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/32873

A1

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

30. Juli 1998 (30.07.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/00268

(22) Internationales Anmeldedatum: 20. Januar 1998 (20.01.98)

(30) Prioritätsdaten:

24. Januar 1997 (24.01.97) 97101143.2 (34) Länder für die die regionale oder

internationale Anmeldung eingereicht

worden ist:

DE usw.

EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHWEIZ, SERUM- & IMPFINSTITUT BERN [CH/CH]; Postfach 2707, CH-3001 Bern (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HASLER, Thomas [CH/CH]; Hopfenweg 14, CH-3007 Bern (CH). FÜRER, Emil [CH/CH]; Pelikanweg 9, CH-3074 Muri (CH).

(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER GBR; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

### Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen

- (54) Title: NEW METHOD FOR ISOLATING POLYSACCHARIDES
- (54) Bezeichnung: NEUES VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON POLYSACCHARIDEN

### (57) Abstract

The invention relates to a method for isolating polysaccharides, in particular for separating endotoxins from capsule polysaccharides of Gram-negative bacterial. The polysaccharides isolated by this method are preferably used for the production of polysaccharide inoculants. The invention furthermore relates to inoculants containing polysaccharides isolated by the method described in this invention.

### (57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von Polysacchariden, insbesondere zur Abtrennung von Endotoxinen von Kapsel-Polysacchariden gram-negativer Bakterien. Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierten Polysaccharide werden vorzugsweise zur Herstellung von Polysaccharidimpfstoffen verwendet. Die Erfindung betrifft ferner Impfstoffe, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierte Polysaccharide enthalten.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Pinnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Prankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo .
BB.	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Turkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL.	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumanien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	Li	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 98/32873 PCT/EP98/00268

### Neues Verfahren zur Isolierung von Polysacchariden

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von Polysacchariden, insbesondere zur Abtrennung von Endotoxinen von Kapsel-Polysacchariden gram-negativer Bakterien. Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierten Polysaccharide werden vorzugsweise zur Herstellung von Polysaccharidimpfstoffen verwendet. Die Erfindung betrifft ferner Impfstoffe, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierte Polysaccharide enthalten.

die Herstellung von Impfstoffen, insbesondere Polysaccharidimpfstoffen aus bakteriellen Polysacchariden ist die Entfernung von Endotoxinen ein kritischer und entscheidender Schritt im Verlaufe der Reinigung der Polysaccharide. Das im Stand der Technik am häufigsten verwendete Verfahren zur Abtrennung von Endotoxinen von bakteriellen Polysacchariden beruht auf einer Phenolextraktion, die gegebenenfalls mehrfach wiederholt werden muß, bis der Endotoxingehalt den von den Gesundheitsbehörden erhobenen Anforderungen entspricht. Dieses Verfahren ist aufwendig und zeitraubend. Darüber hinaus ist die Arbeit mit Phenol unangenehm und verursacht unerwünschten toxischen Abfall. Außerdem sind die mit diesem aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren erzielbaren Ausbeuten an Polysacchariden häufig unbefriedigend. Andere Verfahren aus dem Stand der Technik zur Isolierung von bakteriellen Polysacchariden beruhen auf der Verwendung von Affinitätsäulen. Häufig sind diese für die Gesundheit bedenklich (z.B. die Verwendung von Polymyxin Bhaltigem Säulenmaterial). Darüber hinaus haben viele Säulenmaterialien nur beschränkte Kapazitäten, was für die Gewinnung technisch verwertbarer Ausbeuten an Polysacchariden relativ große und damit teure Säulen bedingt (vgl. z.B. US-A 5,045,456, US-A 5,039,610 und US-A 5,034,519).

Der Erfindung lag somit die Aufgabe zugrunde, ein vereinfachtes, wirtschaftlich sinnvolles und für die Gesundheit weniger belastendes Verfahren zur Isolierung von Polysacchariden bereitzustellen. Die Lösung dieser Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erreicht.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Isolierung von Polysacchariden, wobei man folgende Schritte durchführt:

- (a) Mischen einer bakteriellen Polysaccharidfraktion mit einer Detergenslösung;
- (b) Alkoholzugabe zu einer Endkonzentration, die unter der Konzentration liegt, bei der das Polysaccharid ausfällt;
- (c) Mischen der Lösung;
- (d) Filtrieren der Lösung;
- (e) Abtrennung des Polysaccharids von Detergens und Alkohol.

Bakterielle Polysaccharidfraktionen, die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können, sind durch im Stand der Technik bekannte Verfahren herstellbar; vgl. z.B. Gotschlich et al., J. Exp. Med. 129 (1969), 1349-1365 sowie Schneerson et al., J. Exp. Med. 152 (1980) 361-376. Die Alkoholkonzentration, bei der das Polysaccharid in Gegenwart der Detergenslösung ausfällt, ist für den Fachmann auf konventionelle Weise bestimmbar. Beispielsweise kann diese Konzentration durch einfache Testreihen ermittelt werden.

Das Umsetzen der Lösung, d.h. das Ausfällen des Endotoxins aus der Polysaccharidlösung erfolgt üblicherweise 1 Minute bis 1 Stunde, kann aber auch mehrere Stunden erfolgen. Das erfindungsgemäße Verfahren ist im Gegensatz zu den im Stand der Technik bekannten Verfahren einfach, schnell, billig und verursacht weniger toxischen Abfall. Darüber hinaus sind die

Ausbeuten an Polysaccharid deutlich höher. Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf einer selektiven Alkoholfällung in Gegenwart von mindestens einem Detergens, welches nicht kovalente Interaktionen zwischen Polysacchariden, Lipopolysacchariden und Proteinen aufhebt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der zuzugebende Alkohol Ethanol.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Abtrennung des Polysaccharids von Detergens und Alkohol durch Fällung des Polysaccharids durch weitere Alkoholzugabe.

Diese Ausführungsform des Verfahrens ist besonders vorteilhaft, da die Polysaccharidfällung und damit die Abtrennung von Detergentien und Alkohol durch einfache weitere Zugabe des Alkohols erreicht werden kann. In einer anderen Ausführungsform kann die Fällung des Polysaccharids auch durch Zugabe eines Alkohols erreicht werden, der sich von dem unterscheidet, der in Schritt (b) verwendet wird.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren, wobei die Polysaccharide aus gram-negativen Bakterien stammen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die gram-negativen Bakterien Bakterien der Gattung Haemophilus, Neisseria, Klebsiella oder Escherichia und insbesondere der Art Haemophilus influenzae (Typb), Neisseria meningitidis, Klebsiella pmeumoniae oder Escherichia coli. Bei den hier in Rede stehenden Polysacchariden handelt es sich um Kapsel-Polysaccharide.

Die Isolierung von Polysacchariden aus Bakterien dieser Gattungen bzw. Arten ist deshalb besonders bevorzugt, da sich diese Polysaccharide zur Impfung gegen folgende Krankheiten eignen: Meningitis, Epiglottitis, Otitis media, Pneumonie, Arthritis, Sepsis, nosokomiale Infektionen, Harnwegsinfektionen und Gastroenteritis.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Detergens ein anionisches Tensid. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei das anionische Tensid ein Alkylsulfat, beispielsweise Natriumdodecylsulfat (SDS) ist.

Der Vorteil des Einsatzes von SDS im erfindungsgemäßen Verfahren liegt u.a. darin, daß SDS von einer Vielzahl von Herstellern bezogen werden kann und darüber einen günstigen Verkaufspreis aufweist.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Tensidkonzentration in der der Polysaccharidfraktion in dem oben genannten Schritt (a) zugesetzten Lösung höchstens 20 % (Gew./Gew.). Wie bereits vorstehend erwähnt, ist das Tensid vorzugsweise ein Alkylsulfat und beispielsweise SDS.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist ein Verfahren, wobei die Tensidkonzentration in der Polysaccharidlösung, beispielsweise die SDS-Konzentration, 0,1 % bis 4 % (Endkonzentration, Gew./Gew.) beträgt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Alkohol in Schritt (b) zu einer Endkonzentration zu der Lösung gegeben, die etwa 10 % unter der Konzentration liegt, bei der das Polysaccharid ausfällt.

Es hat sich durch empirische Testreihen herausgestellt, daß die Zugabe des Alkohols im Schritt (b) zu dieser Endkonzentration besonders vorteilhaft ist, weil der Verlust an Polysaccharid bei dieser Konzentration gering ist und Endotoxin trotzdem effizient ausgefällt wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Ausgangskonzentration an Po-

lysacchariden in der Polysaccharidfraktion größer als 10 mg/ml.

Während das erfindungsgemäße Verfahren auch mit geringeren Ausgangskonzentrationen an Polysacchariden in der Polysaccharidfraktion durchgeführt werden kann, sollte die vorstehend genannte Konzentration als Mindestkonzentration besonders aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren, wobei die Filtration durch einen Polymerfilter erfolgt.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird für die Filtration ein Tiefenfilter eingesetzt.

Der Begriff "Tiefenfilter" bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung einen Filter, der im Gegensatz zu einem Membranfilter (2-dimensional) eine 3-dimensionale Struktur (Tiefe) besitzt. Dieser Aufbau hat zur Folge, daß ein Tiefenfilter eine hohe Partikelrückhaltekapazität besitzt und entsprechend nicht so schnell verstopft.

Der Einsatz von Polymer- bzw. Tiefenfiltern hat sich erfindungsgemäß besonders bewährt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß ein Polymerfilter auch Tiefenfilter und umgekehrt ein Tiefenfilter auch ein Polymerfilter sein kann, daß diese Bedingung jedoch nicht zwingend ist.

Die Isolierung der Polysaccharide nach dem erfindungsgemäßen Verfahren stellt sich als besonders effizient dar, wenn zur Filtration Tiefenfilter eingesetzt werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der Polymerfilter und/oder der Tiefenfilter ein Polypropylenfilter.

Die Erfindung betrifft ferner einen Polysaccharidimpfstoff, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er ein Polysaccharid enthält, das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren isoliert wurde. Gegebenenfalls enthält dieser Polysaccharidimpfstoff ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Beispiele für derartige Träger sind Tetanustoxoid, Diphtherietoxoid, Pseudomonas Exotoxin A und Choleratoxin.

Der erfindungsgemäße Polysaccharidimpfstoff ist wie den vorstehenden Ausführungen entnommen werden kann, besonders einfach und billig herstellbar. Seine Herstellung ist darüber hinaus für das Laborpersonal aus gesundheitlicher Sicht besonders unbedenklich. Ein Beispiel für den erfindungsgemäßen Impfstoff ist ein auf Meningokokkenpolysaccharid basierender Impfstoff. Diese wie auch die nachfolgend genannten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Impfstoffs werden parenteral verabreicht, wobei die Verabreichung ein bis mehrere Male und vorzugsweise (wo nicht anders angezeigt) mehrere Male erfolgt. Üblicherweise wird die Verabreichung intramuskular oder subkutan verabreicht, wobei pro Dosis 1-50  $\mu$ g Polysaccharid eingesetzt werden.

Der erfindungsgemäße Polysaccharidimpfstoff eignet sich insbesondere zur Impfung gegen Meningitis, Epiglottitis, Otitis media, Pneumonie, Arthritis, Sepsis, nosokomiale Infektionen, Harnwegsinfektionen oder Gastroenteritis. Darüber hinaus kann der erfindungsgemäße Polysaccharidimpfstoff jedoch auch für die Impfung gegen andere Krankheiten eingesetzt werden, die durch Kapselpolysaccharide tragende gram-negative Bakterien verursacht werden.

Außerdem betrifft die Erfindung ein Konjugat, das aus einem nach dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierten Polysaccharid und einem chemisch damit verknüpften pharmazeutisch verträglichen Protein besteht. Beispiele für derartige Proteine sind Tetanustoxoid, Diphtherietoxoid, Pseudomonas Exotoxin A und Choleratoxin. Bevorzugte Dosen umfassen 1-20  $\mu$ g an Konjugat.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung einen Konjugatimpfstoff, der ein nach dem erfindungsgemäßen Verfahren isoliertes Polysaccharid und chemisch damit verknüpft ein pharmazeutisch verträgliches Protein enthält.

Der erfindungsgemäße Konjugatimpfstoff wird bevorzugt für die Immunisierung bzw. Prophylaxe gegen die vorgenannten Krankheiten eingesetzt.

Insbesondere bevorzugt ist dabei, daß die Immunisierung bei Kleinkindern durchgeführt wird.

Die Erfindung betrifft des weiteren einen Kombinationsimpf stoff, der ein nach dem erfindungsgmäßen Verfahren isoliertes Polysaccharid oder ein erfindungsgemäßes Konjugat sowie eine weitere immunogene Komponente enthält, wobei die zusätzliche immunogene Komponente vorzugsweise eine Immunantwort gegen ein Pathogen induziert, das ein anderes Pathogen als das ist, aus dem das Polysaccharid stammt. Beispiele für einen Kombinationsimpfstoff ist ein Haemophilus influenzae-Impfstoff, in dem das entsprechende Polysaccharid mit Tetanustoxoid konjugiert ist. Zusätzlich können in diesem Impfstoff z.B. Pertussis-, Diphtherie-, Tetanus- und Hepatitis B-Komponenten formuliert werden. Bevorzugte Dosen umfassen 1-20  $\mu$ g an Polysaccharid im Kombinationsimpfstoff, besonders bevorzugt sind 1-10 µg, beispielsweise beim vorstehend beschriebenen Haemophilus influenzae Kombinationsimpfstoff an Haemophilis influenzae-Polysaccharid. Bevorzugte Dosen für Diphtheriekomponenten sind in diesem Impfstoff 15-25 Lf (Limit of flocculation), für Tetanuskomponenten 5-10 Lf und für Pertussiskomponenten mehr als 4 IE (Internationale Einheiten). Der Fachmann kann Dosen/Konzentrationen weiterer Komponenten im erfindungsgemäßen Kombinationsimpfstoff nach Standardverfahren/Standardvorschriften bestimmen. Der erfin-Kombinationsimpfstoff wird vorzugsweise dungsgemäße einmal verabreicht.

Vorzugsweise ist die weitere immunogene Komponente ein Diphterie-, Tetanus-, Pertussis-, Hepatitis B- oder Poliomyelitis-Antigen.

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung eines Polysaccharids, das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren isoliert wurde, als Zwischenprodukt für die Herstellung eines Konjugat- oder Kombinationsimpfstoffes. Das Zwischenprodukt wird dabei mit einem pharmazeutisch verträglichen Protein chemisch zum Konjugat verknüpft. Dementsprechend betrifft die Erfindung vorzugsweise eine Verwendung, wobei der Konjugat- oder Kombinationsimpfstoff als Wirkkomponente ein Konjugat enthält, das aus einem nach dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierten Polysaccharid und einem chemisch damit verknüpften pharmazeutisch verträglichen Protein besteht.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

### Beispiel 1

# Isolierung eines Haemophilus influenzae Typ b Kapsel-Polysaccharids

Eine nach konventionellen Verfahren aufgearbeitete Kapsel-Polysaccharidfraktion (PRP, Polyribosylribitolphosphat) aus Haemophilus influenzae Typ b wird in einer Konzentration von > 10 mg/ml mit einer 4%-igen SDS-Lösung gemischt. Daraufhin wird Ethanol zu einer Endkonzentration zugegeben, die etwa 10 % unter der Konzentration liegt, bei der das Polysaccharid auszufallen beginnt. Die Lösung wird etwa 20 Minuten lang gemischt, wobei auch Zeiträume von 1 Minute bis mehrere Stunden geeignet erscheinen, worauf sich eine Trübung einstellt. Anschließend wird durch einen Polypropylen-Tiefenfilter filtriert. Die Endotoxine werden durch diesen Filtrationsschritt abgetrennt und verbleiben im Filter. Vermutlich sind sowohl Filtrations- als auch Adsorptionseffekte für die Abtrennung der Endotoxine verantwortlich. Das

filtrierte Polysaccharid wird anschließend durch weitere Ethanolzugabe gefällt, wobei das SDS in Lösung verbleibt. Das gefällte Polysaccharid kann durch weitere Ethanolfällungen von bleibenden SDS-Verunreinigungen abgetrennt werden. Eine weitere Aufarbeitung des Polysaccharides sowie die Konfektionierung als Impfstoff, wobei das Polysaccharid vorzugsweise chemisch mit einem geeigneten Trägerprotein verknüpft wird, erfolgt nach im Stand der Technik bekannten, üblichen Verfahren. In der genannten bevorzugten Ausführungsform ist das Polysaccharid auch ein Zwischenprodukt für einen Konjugatimpfstoff.

### Beispiel 2

Isolierung von Neisseria meningitidis Typ (A) und (C) Kapsel-Polysacchariden

Neisseria meningitidis Typ (A) und (C) Kapsel-Polysaccharide wurden den gleichen Verfahrensschritten, wie in Beispiel 1 beschrieben, unterworfen.

Die Ausbeuten an mit den in den Beispielen 1 und 2 beschriebenen Verfahren erhaltenen Polysacchariden sind in Tabellen I und II dargestellt. Es zeigt sich, daß die Ausbeute an Haemophilus influenzae Typ (b) Kapsel-Polysaccharid, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich ist, wesentlich höher ist als Polysaccharid, das mit im Stand der Technik bekannten Verfahren (Phenolextraktion) erhalten werden kann.

PRP-Chargen- nummer	Verfahren	PRP-Menge (g)	Endotoxin vorher nachh (EU/µg/PRP)	er PRP-Ausbeute (%)
27	5 x Phenol	8,3	475 26	67
627095	EtOH/SDS	1,9	72,5 0,11	>95
611496	EtOH/SDS	75	55 <0,05	>95

Bei den Chargennummern handelt es sich um interne Nummern des Anmelders, CH-Serum. Die Chargen wurden nach üblichen Verfahren hergestellt.

Isolierung von N. meningitidis Gruppe C Kapselpolysaccharid (GCMP)

GCMP-Char- gennummer <sup>1</sup>	Verfahren	GCMP-Menge (g)	Endot vorher (EU/µ	oxin nachher g/GCMP)	GCMP-Ausbeute (%)
150396	EtOH/SDS	7,3	46,8	7,7	92
905096	EtOH/SDS	7,5	258	1,1	77
906096	EtOH/SDS	7,8	85	0,1	67

### <u>Patentansprüche</u>

- 1. Verfahren zur Isolierung von Polysacchariden, wobei man folgende Schritte durchführt:
  - (a) Mischen einer bakteriellen Polysaccharidfraktion mit einer Detergenslösung;
  - (b) Alkoholzugabe zu einer Endkonzentration, die unter der Konzentration liegt, bei der das Polysaccharid ausfällt;
  - (c) Mischen der Lösung;
  - (d) Filtrieren der Lösung;
  - (e) Abtrennung des Polysaccharids von Detergens und Alkohol.
- Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Alkohol Ethanol ist.
- 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Abtrennung des Polysaccharids durch Fällung des Polysaccharids durch weitere Alkoholzugabe erfolgt.
- 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Polysaccharide aus gram-negativen Bakterien stammen.
- 5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die gram-negativen Bakterien Bakterien der Gattung Haemophilus, Neisseria, Klebsiella oder Escherichia und insbesondere der Art Haemophilus influenzae (Typ b), Klebsiella pneumoniae, Neisseria meningitidis oder Escherichia coli sind.
- 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Detergens ein anionisches Tensid ist.
  - 7. Verfahren nnach Anspruch 6, wobei das anionische Tensid ein Alkylsulfat, beispielsweise Natriumdodecylsulfat (SDS) ist.

- 8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, wobei die Tensidkonzentration in der der Polysaccharidfraktion in Schritt (a) zugesetzten Lösung höchstens 20 % (Gew./Gew.) beträgt.
- 9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Tensidkonzentration in der Polysaccharidlösung 0,1 % bis 4 % (Endkonzentration, Gew./Gew.) beträgt.
- 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der Alkohol in Schritt (b) zu einer Endkonzentration zu der Lösung gegeben wird, die etwa 10 % unter der Konzentration liegt, bei der das Polysaccharid ausfällt.
- 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Ausgangskonzentration an Polysacchariden in der Polysaccharidfraktion größer als 10 mg/ml ist.
- 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Filtration durch einen Polymerfilter erfolgt.
- 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Filtration durch einen Tiefenfilter erfolgt.
- 14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei der Polymerfilter und/oder der Tiefenfilter ein Polypropylenfilter ist.
- 15. Polysaccharidimpfstoff, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Polysaccharid enthält, das nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 isoliert wurde, sowie gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
- 16. Polysaccharidimpfstoff nach Anspruch 15 zur Prophylaxe gegen Meningitis, Epiglottitis, Otitis media, Pneumonie, Arthritis, Sepsis, nosokomiale Infektionen, Harnwegsinfektionen oder Gastroenteritis.

- 17. Konjugat, dadurch gekennzeichnet, daß es aus einem Polysaccharid besteht, das nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 isoliert wurde, sowie einem chemisch damit verknüpften pharmazeutisch verträglichen Protein.
- 18. Konjugatimpfstoff, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Polysaccharid enthält, das nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 isoliert wurde, sowie ein chemisch damit verknüpftes pharmazeutisch verträgliches Protein.
- 19. Kombinationsimpfstoff, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Polysaccharid, das nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 isoliert wurde oder ein Konjugat nach Anspruch 17, sowie mindestens eine weitere immunogene Komponente enthält.
- 20. Kombinationsimpfstoff nach Anspruch 19, wobei die weitere immunogene Komponente ein Diphterie-, Tetanus-, Pertussis-, Hepatitis B- oder Poliomyelitis-Antigen ist.
- 21. Verwendung eines Polysaccharids, das nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 isoliert wurde, als Zwischenprodukt für die Herstellung eines Konjugatoder Kombinationsimpfstoffes.
- 22. Verwendung nach Anspruch 20, wobei der Konjugat- oder Kombinationsimpfstoff als Wirkkomponente ein Konjugat enthält, das aus einem Polysaccharid, das nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 isoliert wurde und einem chemisch damit verknüpften pharmazeutisch verträglichen Protein besteht.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internation No PCT/EP 98/00268

A. CLASSIF IPC 6	C12P19/04 A61K39/02 A61K39/3	885 A61K47/36	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
According to	International Patent Classification (IPC) or to both national classifica	tion and IPC	·
B. FIELDS			
	ourmentation searched (classification system followed by classification C12P A61K	n symbols)	
Documentati	ion searched other than minimum documentation to the extent that su	ich documents are included in the fields sea	urched
Electronio di	ata base consulted during the international search (name of data bas	se and, where practical, search terms used)	
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
C. DOCUME	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with Indication, where appropriate, of the rele	want passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 407 037 A (MERCK & CO. INC. January 1991 see the whole document	NC.) 9	1-22
X	E. C. GOTSCHLICH ET AL.: "Human to the Meningococcus."  J. EXP. MED.,	Immunity	1-22
	vol. 129, no. 4, 1969, pages 1349-1365, XP002063730 cited in the application see the whole document		
		•	
Furt	ther documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members are listed	in annex.
"A" docum consi "E" earlier filing "L" docum which citatic "O" docum other "P" docum later	ategories of cited documents:  nent defining the general state of the art which is not dered to be of particular relevance document but published on or after the international date ent which may throw doubts on priority claim(s) or a cited to establish the publication date of another on or other special reason (as specified) ment referring to an oral disclosure, use, exhibition or means ent published prior to the international filling date but than the priority date claimed	"T" later document published after the interest or priority date and not in conflict with cited to understand the principle or the invention.  "X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot involve an inventive step when the description of the invention of the involve and document is combined with one or ments, such combination being obviding the interest.  "A" document member of the same patern.	the application but leary underlying the claimed invention it be considered to coument is taken alone claimed invention eventive step when the core other such docupus to a person skilled
ļ	28 April 1998	2 2. 05. 98	<u>.</u>
Name and	mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  NL - 2280 HV Rijswijk  Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  Eav. (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Douschan, K	;

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. \_nal Application No PCT/EP 98/00268

cited in search report	Publication	Patent family	Publication
	date	member(s)	date
EP 0407037 A 09	9-01-91 CA CY DE HI JF US US	2018709 A 1982 A 69012682 D 8097 A 3095201 A 5019502 A 5045456 A 5039610 A	05-09-97 27-10-94 24-01-97 19-04-91 28-05-91 03-09-91

### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. .iales Aktenzeichen
PCT/EP 98/00268

A. KLASSIF IPK 6	izierung des anmeldungsgegenstandes C12P19/04 A61K39/02 A61K39/38	35 A61K47/36	
Nach der Inte	ernationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klass	fikation und der IPK	
	CHIERTE GEBIETE		
Recherchier IPK 5	ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole C12P A61K	))	
Recherchier	te aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, sow	eit diese unter die recherchierten Gebiete fa	ilen ·
Während de	r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Na	me der Datenbank und evtl. verwendete Su	chbegriffe)
C ALSWE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	der in Betracht kommenden Teile.	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 407 037 A (MERCK & CO. INC. 9.Januar 1991 siehe das ganze Dokument	NC.)	1-22
X	E. C. GOTSCHLICH ET AL.: "Human to the Meningococcus." J. EXP. MED., Bd. 129, Nr. 4, 1969, Seiten 1349-1365, XP002063730 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	Immunity	1-22
	<b></b>		
	tere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu lehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie	
* Besonder  *A* Veröffe aber i  *E* Altares Anme *L* Veröffe soli o ausge *O* Veröffe eine i  'P* Veröffe dem	e Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : Inttichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, Inicht als besonders bedeutsam anzusehen ist  Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Idedatum veröffentlicht worden ist Intlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- Inen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer en im Recherchenbencht genannten Veröffentlichung belegt werden der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie efführt) entlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	kann nicht als auf effinderischer Tätigk werden, wenn die Veröffentlichung mit Veröffentlichungen dieser Kategorie in diese Verbindung für einen Fachmann "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Absendedatum des internationalen Re-	worden ist und mit der zum Verständnis des der oder der ihr zugrundeliegenden tung; die beanspruchte Erfindung hung nicht als neu oder auf ohtst werden tung; die beanspruchte Erfindung eit beruhend betrachtet siber oder mehreren anderen Verbindung gebracht wird und naheliegend ist Patentfamilie ist
	28.April 1998	22. 05. 98	
Name und	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijawijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018	Bevollmächtigter Bediensteter  Douschan, K	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

International Aktenzeichen
PCT/EP 98/00268

Im Recherchenbericht	Datum der	Mitglied(er) der	Datum der
angeführtes Patentdokument	Veröffentlichung	Patentfamilie	Veröffentlichung
EP 0407037 A	09-01-91	CA 2018709 A CY 1982 A DE 69012682 D HK 8097 A JP 3095201 A US 5019502 A US 5045456 A US 5039610 A	12-12-90 05-09-97 27-10-94 24-01-97 19-04-91 28-05-91 03-09-91 13-08-91